

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861180

研究課題名(和文)肉腫に対する抗がん剤複合多層カーボンナノチューブの効果

研究課題名(英文)Effects of anticancer drug-MWCNT(multi-walled carbon nanotube) complex for sarcoma

研究代表者

青木 薫 (AOKI, Kaoru)

信州大学・医学部・准教授(特定雇用)

研究者番号：30467170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨肉腫を代表とする骨軟部肉腫の治療効果を向上させるために、drug delivery systemとしての働きを期待されている多層カーボンナノチューブ(multi-walled carbon nanotubes; MWCNT)に抗がん剤を複合させ、その骨肉腫に対する効果を評価した。抗がん剤複合MWCNTは骨肉腫細胞に対して、抗がん剤単独、MWCNT単独で投与するよりも、優れた抗腫瘍効果を示した。

研究成果の概要(英文)：Carbon nanotubes are expected as drug delivery system. To improve the effect of treatment of the bone and soft tissue sarcomas as represented by osteosarcoma, we made anticancer drug-MWCNT (multi-walled carbon nanotube) complex. We evaluated the effects of anticancer drug-MWCNT complex for osteosarcoma. Anticancer drug-MWCNT complex showed stronger antitumor effects than only anticancer drug and only MWCNTs.

研究分野：整形外科学

キーワード：肉腫 カーボンナノチューブ drug delivery system

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨軟部肉腫の治療には、手術、抗がん剤による化学療法、放射線療法などが行われているが、肺や脳などに遠隔転移を生じ、救命ができない患者が後を絶たない。骨軟部肉腫が遠隔転移を生じた場合、手術で病変を全て切除することは困難であり、治療法は抗がん剤の全身投与による化学療法しか選択肢が無いのが現状である。しかし、骨軟部肉腫の症例では、化学療法に抵抗性の患者が多い。

(2) カーボンナノチューブ (Carbon Nanotube, CNT) はほぼ純粋な炭素原子から構成される直径がナノサイズの繊維状のナノ微粒子であり、その優れた導電性、熱伝導性、力学的強度などの物理化学的特性から、様々な分野での利用が期待されている。我々はこれまで、CNT の医療材料としての臨床応用を目指し、その生体親和性について評価を行ってきており、CNT の安全性を確認している()。また CNT を薬剤の drug delivery system (DDS) としての研究が行なわれており()、臨床応用が期待されている。

2. 研究の目的

(1) CNT は表面や内部を薬剤などの化学物質で修飾することにより、それらの物質の特性を備えたナノ微粒子となることが予測される。本研究では、抗がん剤複合 CNT の作成法を確立し、その性質を評価する。

(2) また本研究では、CNT および作成した抗がん剤複合 CNT を骨肉腫細胞、肉腫モデルマウスに添加、投与することにより、その抗腫瘍効果を確認する。

本研究の目的は、抗がん剤複合 CNT を作成し、その骨肉腫に対する抗腫瘍効果の評価し、優れた効果を持った骨軟部肉腫の治療法を確立することである。

3. 研究の方法

(1) 直径約 60nm、長さ約 10 μ m の多層カーボンナノチューブ (multi-walled carbon nanotubes; MWCNT) (MWNT7, 保土谷化学工業株式会社) に界面活性剤である Pluronic® F-127 (SIGMA-ALDRICH) を添加し、純水中で horn-type の Ultrasonicator (US300T, Nissei) を用いて均一分散させた。抗がん剤であるドキシソルビン (Doxorubicin, DOX) (アドリアシン, 協和発酵キリン株式会社) を添加して sonication を行い、抗がん剤複合 CNT である DOX 複合 MWCNT を作成した。

作成した DOX 複合 MWCNT をフォトルミネッセンス法 (PL (Photoluminescence) 法) にて解析し、DOX 複合 MWCNT の蛍光を測定し、DOX と MWCNT の結合状態を評価した。

(2) ヒト骨肉腫細胞である 143B 細胞 (RBRC-RCB0701 143B/TK (-) neo (R)) を解凍し、培地 (DMEM (L-グルタミン含有), 10% FBS) に 5 \times 10⁴ cell/mL の濃度で播種、CO₂ インキュベーターで培養した (37^oC, CO₂ 濃度 5%, 湿度 95%)。24 時間後に MWCNT, DOX, DOX 複合 MWCNT を添加し、添加後 24 時間で AlamarBlue Assay を行い、143B 細胞の増殖を評価した。

(3) 免疫不全動物であるヌードマウス (BALB/c-nu/nu, 日本エスエルシー株式会社) の脛骨に 143B 細胞を 10⁶ 個注射し、xenograft モデルを作成した。同時に CNT, DOX を同部位に投与し、投与後 4 週でマウスを安楽死させて肺を摘出し、ホルマリン固定した。肺を 100 μ m の厚さごとに 1 枚の薄切標本を採取し、1 個体ごとに 5 枚のプレパラートを作成した。標本はヘマトキシリン-エオシン染色をし、1 割面ごとに光学顕微鏡で観察し、肺転移の数を測定した。

4. 研究成果

(1) MWCNT と DOX を、界面活性剤である Pluronic® F-127 と混合し、sonication を 30 分行うことにより、DOX 複合 MWCNT を作成することができた。MWCNT の濃度を変え、DOX を 100 μ g/mL に対し、MWCNT の濃度をそれぞれ 20, 50, 100, 200, 500 μ g/mL とした (図 1)。



MWCNT含有量(μ g/ml)	50	100	500
DOX含有量(μ g/ml)	100	100	100

図1 DOX複合MWCNTの外観

DOX 複合 MWCNT の PL 法による解析により、MWCNT の濃度依存性に DOX の蛍光が減少することが観察され、MWCNT に DOX がよく吸着していることが確認できた (図 2)。

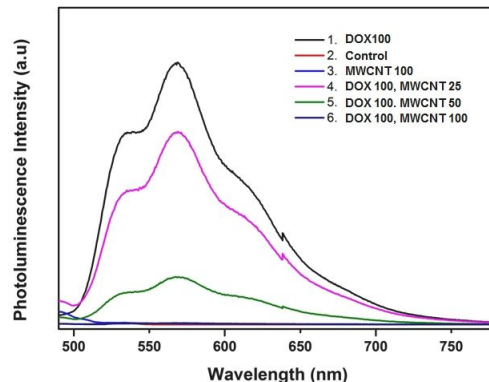


図2 DOX複合MWCNTのPL法解析

(2) 培養した 143B 細胞に MWCNT, DOX, DOX 複合 MWCNT を添加し 24 時間後に位相差顕微鏡にて細胞の観察を行った。Control では 143B 細胞が培養皿に接着して増殖していることが確認でき(図 3a), DOX(1 μ g/ml)では接着している細胞が少なく,壊死して浮遊している細胞が認められた(図 3b)。MWCNT(1 μ g/ml)では, MWCNT の黒い粒子が 143B 細胞に取り込まれている事が確認でき,接着細胞は Control より少なかった(図 3c)。DOX(1 μ g/ml)-MWCNT(1 μ g/ml)でも MWCNT(1 μ g/ml)と同様に, 143B 細胞内に MWCNT の黒い粒子が取り込まれることが観察できたが,接着細胞の数は, MWCNT(1 μ g/ml), DOX(1 μ g/ml)と明らかな差を認めなかった(図 3d)。DOX(1 μ g/ml)-MWCNT(5 μ g/ml)では,培養皿に接着している 143B 細胞はさらに少なく見えた(図 3e)。

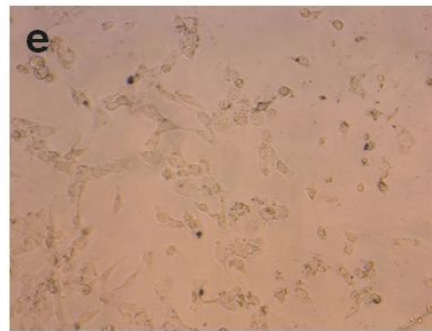
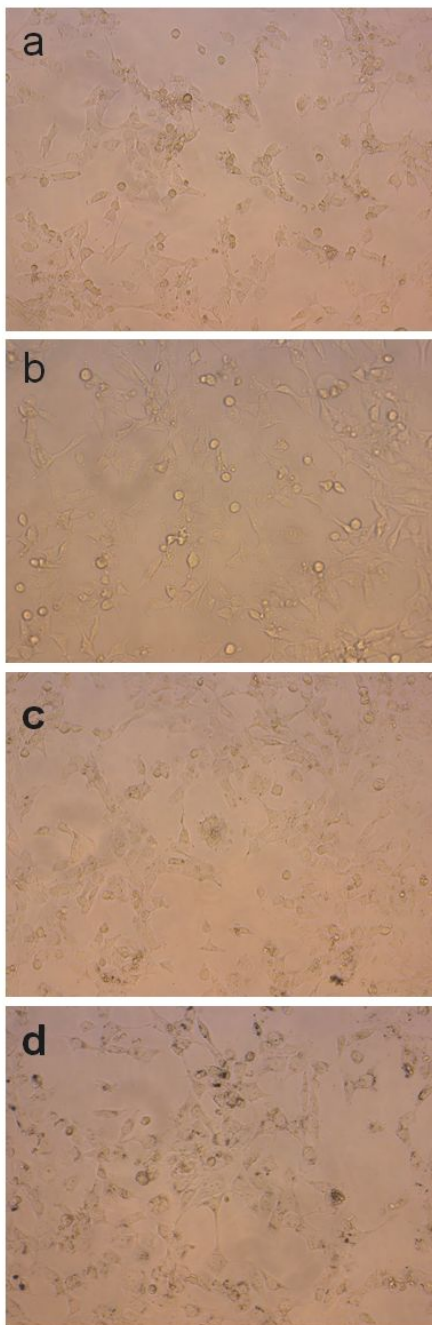


図3 ヒト骨肉腫細胞;143B細胞

MWCNT, DOX, DOX 複合 MWCNT を添加した 24 時間後に AlamarBlue Assay にて 143B 細胞の増殖能を測定した。

MWCNT(1 μ g/ml)のみ, DOX(1 μ g/ml)のみをヒト骨肉腫細胞 143B 細胞に添加した群に対して, DOX 複合 MWCNT を添加した群にて AlamarBlue Assay にて 143B 細胞の増殖能が抑制されていることが観察された。DOX 複合 MWCNT では, MWCNT の濃度を, 培養液中の最終濃度を 0.2 μ g/ml, 0.5 μ g/ml, 1 μ g/ml, 2 μ g/ml, 5 μ g/ml と濃度を変更して検討を行った。DOX(1 μ g/ml) 複合 MWCNT(0.2 μ g/ml)から DOX(1 μ g/ml)複合(5 μ g/ml)までの各群に, 明らかな MWCNT の濃度依存性な 143B 細胞の増殖能に対する影響を見出すことはできなかったが, MWCNT(1 μ g/ml)のみおよび DOX(1 μ g/ml)のみを 143B 細胞に添加した群に対して, 143B 細胞の増殖を最も抑制した DOX(1 μ g/ml)複合 MWCNT(1 μ g/ml)では, 優位な効果を認めた(図 4)。

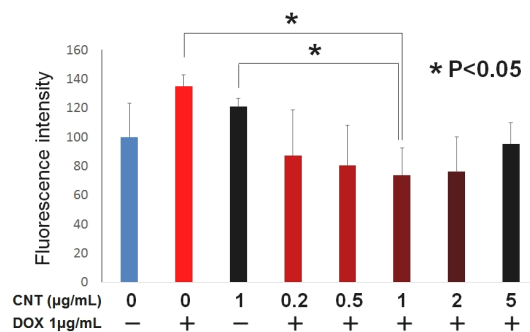


図4 143B細胞のAlamarBlue Assay

(3) 免疫不全マウスであるヌードマウス (BALB/c-nu/nu)の脛骨にヒト骨肉腫細胞; 143B 細胞を注射し, 骨肉腫モデルマウスを作成した。注射用骨肉腫細胞液に MWCNT を分散させて同時に注射し, in vivo にて MWCNT の骨肉腫への効果を評価した。陽性コントロールとして DOX を使用した。

注射後 4 週で肺を取り出して切片標本を作成し, 肺転移数を評価した。Control 群では多くの切片で複数の肺転移を認めた(図 5a, scale bar 2mm), DOX(10 μ M)群および MWCNT (10 μ g/ml)群では, 0~1,2 個の転移性病変を認めた(図 5b, c, scale bar 2mm)。

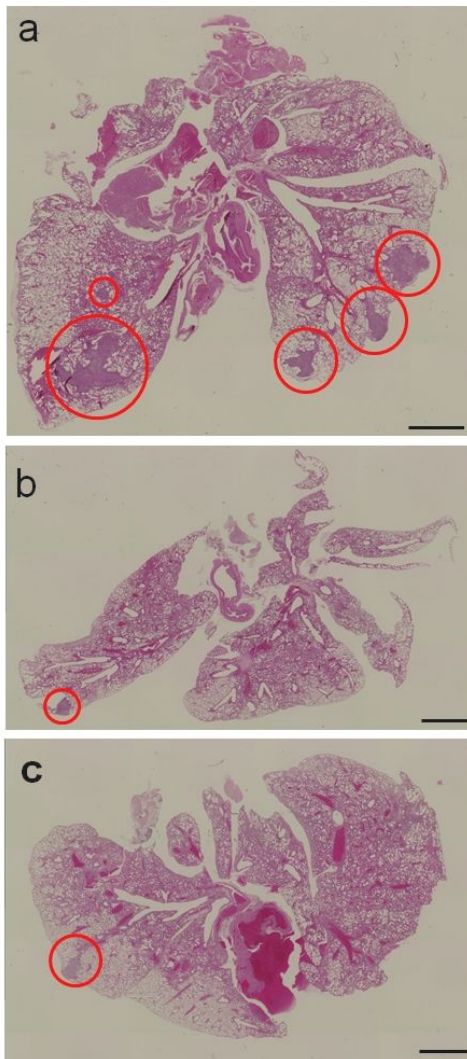


図5 骨肉腫モデルマウスの肺

肺転移数は、DOX群、MWCNT群ともに濃度依存性に抑制され、DOX(10 μ M)群、MWCNT(10 μ g/ml)群ではControl群に比べ、有意に肺転移数が少なかった(図6)。

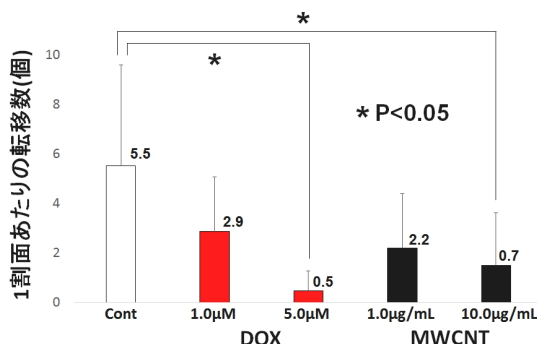


図6 骨肉腫モデルマウスの肺転移数

<引用文献>

Usui Y, et al, Carbon nanotubes with high bone-tissue compatibility and bone-formation acceleration effects. Small. 4(2), 2008, 240.

Hara K, et al, Evaluation of CNT toxicity by comparison to tattoo ink. Materials Today, 14(9), 2011, 434.

Takanashi S, et al, Carcinogenicity evaluation for the application of carbon nanotubes as biomaterials in rasH2 mice. Sci Rep. 2, 2012, 498.

Zhang W. et al, The application of carbon nanotubes in target drug delivery systems for cancer therapies. Nanoscale Research Letters. 6(1), 2011, 555.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計4件)

Kaoru Aoki, Masanori Okamoto, Manabu Tanaka, Takashi Takizawa, Kazushige Yoshida, Atsushi Sobajima, Hiroyuki Kato, Hisao Haniu, Naoto Saito, Antitumor effects for osteosarcoma by multi-walled carbon nanotubes, 10th AACR-JCA Joint Conference, Maui, USA, 16-20 February, 2016.

青木 薫, 高梨誠司, 岡本正則, 小林伸輔, 野村博紀, 田中 学, 滝沢 崇, 大石 歩, 加藤博之, 薄井雄企, 羽二生久夫, 齋藤直人, 骨肉腫モデルマウスに対するカーボンナノチューブの効果, 第30回日本整形外科学会基礎学術集会, 2015年10月22-23日, 富山.

Kaoru Aoki, Hisao Haniu, Masayuki Shimizu, Masanori Okamoto, Shinsuke Kobayashi, Hiroki Nomura, Hiroyuki Kato, Yuki Usui, Naoto Saito, Anti-tumor effects for osteosarcoma cells by carbon nanotubes, 27th European Conference on Biomaterials, 30 August-3 September, 2015, Krakow, Poland.

Kaoru Aoki, Masanori Okamoto, Shinsuke Kobayashi, Hiroki Nomura, Manabu Tanaka, Hiroyuki Kato, Yuki Usui, Hisao Haniu, Naoto Saito, Effects for osteosarcoma cells by carbon nanotubes, ANZBMS 24th Annual Scientific Meeting, 7-10 September, 2014, Queenstown, New Zealand.

6. 研究組織

(1)研究代表者

青木 薫 (AOKI, Kaoru)

信州大学・医学部・准教授(特定雇用)

研究者番号: 30467170

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

高 栄一 (KO, Yong-il)

信州大学・工学部

金 隆岩 (KIM, Yoong Ahm)

全南国立大学・高分子融合素材工学部・教授